

## 人工血管と再生型血管

国立循環器病研究センター研究所生体医工学部

山岡 哲二

Tetsuji YAMAOKA



### 1. はじめに

我が国における人工血管開発の歴史は長い<sup>1)</sup>。「人工臓器と再生医療の融合」からは、1980年代に精力的に研究されたハイブリッド (hybrid) 型人工血管をイメージされる読者も多いと思う<sup>2)~4)</sup>。小口径人工血管を開存させるために、血管内皮細胞を内腔に播種するという戦略であった。本稿では、大・中・小口径血管を対象として、生体内で分解しない人工血管と、生体内で徐々に分解して組織で置換されることを期待する再生型の人工血管を比較して考える。

### 2. 非分解性人工血管と分解性人工血管

我が国では、年間約70,000本の人工血管が使用され、その市場は80億円に上っている。世界で初めての合成材料製の人工血管は1952年に報告され、柔軟で強靱なポリ塩化ビニル繊維で作製された<sup>5)</sup>。表1には、現在、人工血管に用いられる材料を示した<sup>6),7)</sup>。非分解性合成人工血管としては、Braun社やBoston Scientific社などからPET繊維製血管が、Bard社やGore社などからePTFE製血管が販売されており、また、Thoratec社は針穴からの血液漏れを抑止したポリウレタン製血管がバスキュラーアクセス用として販売している<sup>8)</sup>。それぞれ、7 mmや5 mm以上の口径で高い開存性が得られている。これらの人工血管は、いずれも非分解性材料であるので永久に生体内に残存する。また、メドトロニック社製コンテグラはウシ頸動脈をグルタルアルデヒド (GA) で架橋しているために分解性が抑制され、

1990年代から脱細胞ヒト血管 (ホモグラフト) と同等の12年以上の長期成績も報告されている<sup>9)</sup>。しかし中・大口径血管としてのみであり、小口径血管としての成績は優れず、臨床化はされていない。

分解性人工血管に期待される性能は、自己組織化、継続的炎症や感染リスクの軽減、遠隔期での肥厚の回避、小児領域で用いられたときに患者の成長に追従できることなどである。東京女子医科大学の新岡・松村らは、ポリ $\alpha$ ヒドロキシ酸の代表であるポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリ $\epsilon$ カプロラクトンからなる内径10 mm程度の分解性人工血管 (*in situ* tissue-engineering vasculature) を開発した<sup>10),11)</sup>。大動物のみならず臨床でも優れた開存性と成長性を報告している。生体由来物質で作製された人工血管としては、1986年にコラーゲン製血管の動物移植が報告されているが、未だ臨床化には至っていない。一方、ヒト血管から細胞成分を除去したホモグラフトはすでに臨床応用されている。実は、血管組織そのものを人工血管とする研究の歴史は長い<sup>12)</sup>。1950年頃にはアルコール処理したヒト、ヒツジ、ウマの動脈が臨床でも用いられている。よく知られているCryoLife社のSyner Graft<sup>TM</sup><sup>13)</sup>は、浸透圧により細胞成分を破壊した後、酵素による分解と細胞残渣の除去により作製されている。血管組織は80%以上が細胞外マトリックス (ECM) 成分であるため、脱細胞によって多孔質やスポンジ状になることはなく、力学物性にもほとんど変化はない。移植部位でのコンプライアンスのマッチングに優れ、また心臓弁などの複雑な形状も維持されていることから、上市されているホモグラフトに対する注目度は極めて高い。しかしながら、これらの再生型血管の実用化が、5 mm以上の血管や心臓弁などの大型循環器系組織に限られているのも現実であり、小口径血管における現状は非分解性合成血管と同じである。

#### ■ 著者連絡先

国立循環器病研究センター研究所生体医工学部

(〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1)

E-mail. yamtet@ncvc.go.jp

表1 人工血管と再生型血管に用いられる素材

	人工血管(非分解性)	再生型血管(分解性)
合成材料	ポリエチレンテレフタレート (PET) 延伸ポリテトラフルオロエチレン (ePTFE) ポリアウレタン	ポリ $\alpha$ ヒドロキシ酸
生体由来材料	化学架橋ウシ血管	脱細胞化ヒト血管 コラーゲン

### 3. 小口径血管への挑戦

歴史的に、小口径人工血管の開発戦略としては、超抗血栓性表面の構築が選択されてきた<sup>14)</sup>。超親水性やタンパク質分子排除界面などがその例であるが、臨床応用の可能性を期待させるような動物実験結果は得られていない。現在、直径3 mmのePTFE製人工血管も販売されているが、小児BT (Blalock-Taussig) シヤントという特殊な短い血管の使用に限られる。小口径血管においては、遠隔期における継続的な刺激が開存性を大きく低下させることから、その解決策の1つとして再生型血管が注目されている。生体内で分解吸収されるとともに、本来の生体組織と置き換えれば、遠隔期でも安定した開存が得られると期待されるが、なかなか、絵に描いたようにはうまくいかない<sup>15)</sup>。

新潟らのアプローチと同じように、生分解性高分子で作製した小口径人工血管は多くグループで研究されている。たとえば、Kuwabaraらは、電解紡糸法により内径0.7 mm、長さ7 mmのポリ $\epsilon$ カプロラクトン (PCL) 製の人工血管を作製して、ラット頸動脈への移植と1年間の追跡を実施し、再生型血管に対する重要な結果を報告している(図1)<sup>16),17)</sup>。PCLは柔軟な材質ではあるが生体内分解は遅いので1年後にも残存している。平滑筋アクチン陽性の細胞も徐々に増加し自己組織化が進んでいるが、再生にはさらに時間がかかるようである。

Naritaらは、尿管を脱細胞処理することで得られるチューブ構造を小口径血管として使用して半年まで追跡し、チューブ内腔に内皮細胞を播種することで開存性が向上することを示した<sup>18)</sup>。1999年、Campbellらは、腹腔内で生体組織からなる細いチューブを作製して小口径人工血管として利用する手法を報告した<sup>19)</sup>。彼らは、外径が3~5 mmで長さ1~2 cmのシリコンチューブをラットあるいはウサギの腹腔に埋入した。2週間後、シリコンチューブは、数層の筋線維芽細胞層、コラーゲンマトリックス、および中皮層で覆われ、この新生組織をチューブから取り外して、成長も期待できる小口径人工血管として利用する手法を報告し、頸動脈および腹部大動脈で4ヶ月の開存性

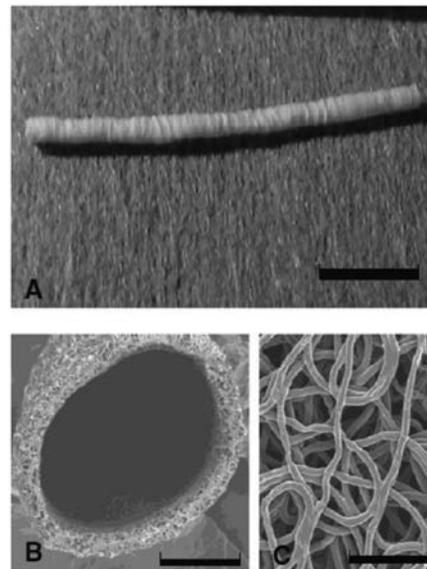


図1 生分解性高分子で作成した小口径血管。外観 (A) と走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真 (B, C)<sup>16)</sup>

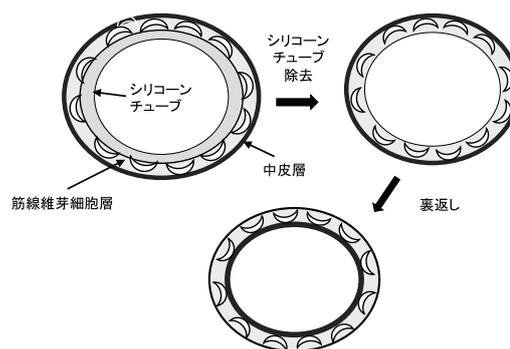


図2 腹腔内でのチューブ状組織の構築<sup>19)</sup>

や組織化過程などを達成した(図2)。その後、さらに複雑な形状として、中山らは心臓弁等への適応研究も精力的に進めている<sup>20)</sup>。

さらに、細胞を利用して小口径血管を作製するアプローチも、複数のグループから報告されている。Norotteらは、バイオプリンターを用いて、アガロースロッドと細胞ス

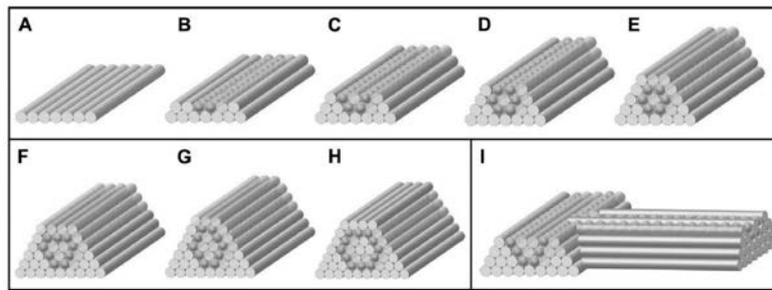


図3 細胞からなるチューブ構造の再構築<sup>21)</sup>

アガロースロッドとスフェロイドをバイオプリンターで配列。  
Reprinted from Biomaterials, 30, Norotte C, Marga FS, Niklason LE, et al, Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting, with permission from Elsevier

フェロイドを巧みに配列させて、細胞からなるチューブ構造を作製した(図3)<sup>21)</sup>。このような取り組みは多いが、まだ、*in vitro*でのチューブ構造の作製の段階と言わざるを得ない。実際の血管では8割程度が細胞外マトリックスであり、細胞成分は2割程度しかないことを考えると、細胞からなるチューブと血管との相違は小さくないが、今後、血管として機能することの証明が待たれる。

#### 4. 小口径血管開発を目指した我々のアプローチ

我々は、高圧処理による組織脱細胞処理を開発してきた。約10,000気圧という超高圧で処理した後に洗浄することで、構造タンパク質の変性を抑えて細胞成分を除去する。藤里ら(現・大阪工業大学教授)とともに、ミニブタの大口徑血管置換などを精力的に進めたが、小口径での脱細胞血管の開存性は必ずしも高くない<sup>22),23)</sup>。脱細胞組織は、血液凝固を誘導するコラーゲン組織を含んでいるためであり、Naritaらの検討でもその様子がうかがえる<sup>18)</sup>。また、ラットなどを用いた小口径人工血管の開存は古くから報告されているにもかかわらず実用化に至らない原因は、これらの血管が臨床で要求されるサイズではないことやラットは比較的開存させやすい動物種であることが考えられる。

我々は、糖尿病性下肢虚血に対するディスタルバイパスを意識して非臨床proof of concept (POC)を取得するために、内径2 mm、長さ30 cmの血管開発に着手した。ベース基材として、合成材料や生体由来材料などを検討したが、最終的には、生体血管とほぼ同様のコンプライアンスを有し、自己組織と置き換わる可能性がある脱細胞組織が良い結果につながった<sup>24)</sup>。早期内皮化を誘導する新たな戦略として、脱細胞化血管内腔面で末梢血中を循環しているCD34陽性細胞(血管内皮前駆細胞)を特異的に補足するために、細胞特異的なREDVペプチドリガンドを内腔壁に配列化させた(図4)。多くの課題はあったが、最終的には、

ダチョウ頸動脈を基材として用いることでサイズのな問題を解決した。我が国では、意外に多くのダチョウが食肉用として飼育されており、飼育環境が良好であるのみならず安定供給ルートも確保できる。ダチョウ頸動脈を利用することで、内径2 mm、長さ30 cmの人工血管を作製した(この時点ではチューブ状構造体とも呼称するのが適切かも知れない)。

さて、次に、このような長い血管の開存性を評価する方法が問題である。最終的には、共同研究者の馬原淳室長のアイデアで、ミニブタ大腿動脈-大腿動脈交差バイパス術(FFバイパス術)での評価を進めた(図5)。驚くべきことに、内腔処理をしない脱細胞血管が数日以内に完全塞栓するのに対して、REDV処理した血管においては3週間にわたって全例開存という結果が得られた<sup>24)</sup>。エコー検査により血流値は正常であること、また、血管内視鏡観察により内腔面には血栓が存在しないことも確認された。さらに、3週間移植後の血管を取り出して全長30 cmの中央部を観察すると、すでにフォンビレブランド因子陽性、ビメンチン陽性の内膜が確認された。埋入3週間ではあるが石灰化陰性(von Kossa染色)が確認された(図6)。

このような開存性の機序を少しでも解明するために、ブタに装着した人工心肺の回路内に、ダチョウ由来脱細胞血管をセットして1時間後の様子を観察したところ、ヘパリンコントロール下にもかかわらず、未修飾脱細胞血管表面には激しい血栓形成が確認され、REDVで修飾した血管内腔には血栓形成は認められなかった。今回の修飾ペプチド分子が、コラーゲンヘリックスに結合するために、その血栓形成をシールドしたためではないかと考えている。現在、ミニブタおよびヤギの下肢動脈置換などで半年までの経過を観察しており、その詳細な解析と、当初戦略とした血管内皮前駆細胞補足による効果も検証する必要がある。

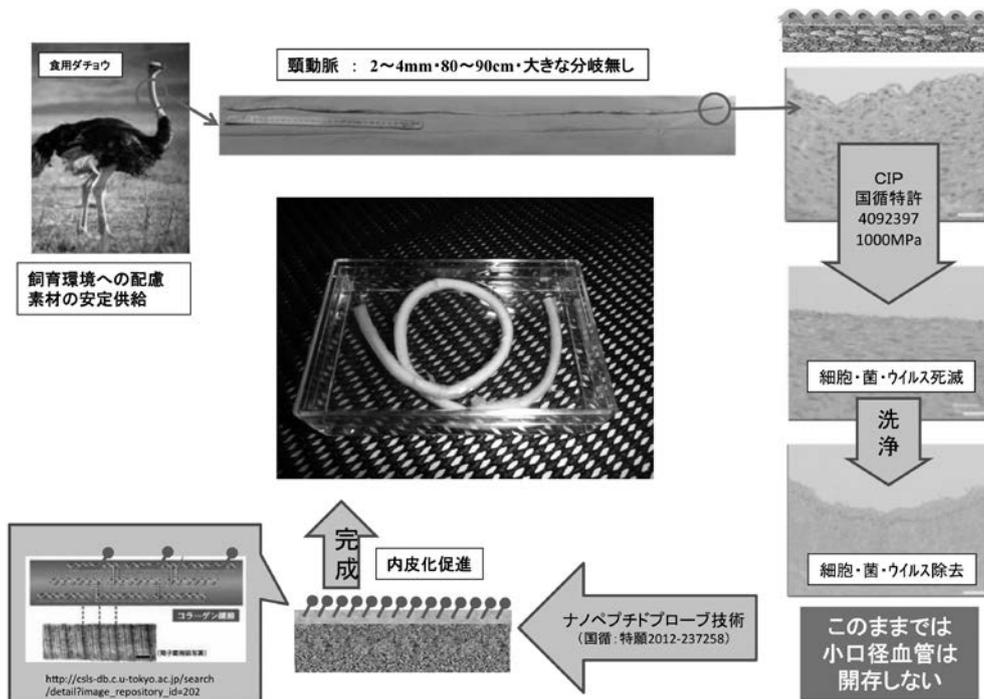


図4 ダチョウ由来小口径人工血管 (内径2 mm, 長さ30 cm) の開発コンセプト

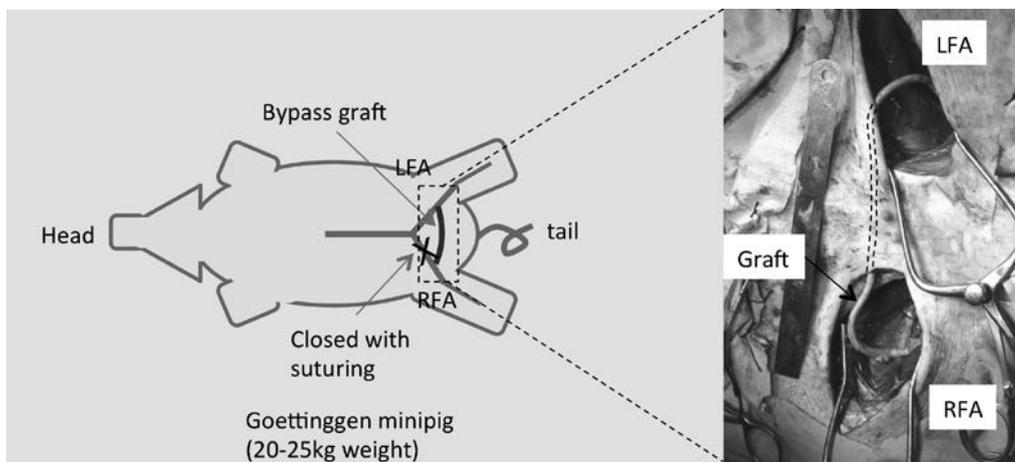


図5 ミニブタ大腿動脈-大腿動脈交差バイパス術 (FFバイパス術)<sup>24)</sup>

## 5. おわりに

我々が達成した小口径人工血管の高い開存性は、生体組織と極めて近い物性を有する脱細胞組織を選択したこと、および、末梢血中を循環する血管内皮前駆細胞を効率よく補足するという、いわば積極的抗血栓戦略によって達成されたと考えている。人工血管の完全な分解と組織への置換を確認するために、さらに長期の検討を進める。

## 謝 辞

本研究は、循環器病研究開発費 (22-2-4)、および、戦略的イノベーション創出推進プログラム (S-イノベ) によって実施された。

本稿の著者には規定されたCOIはない。

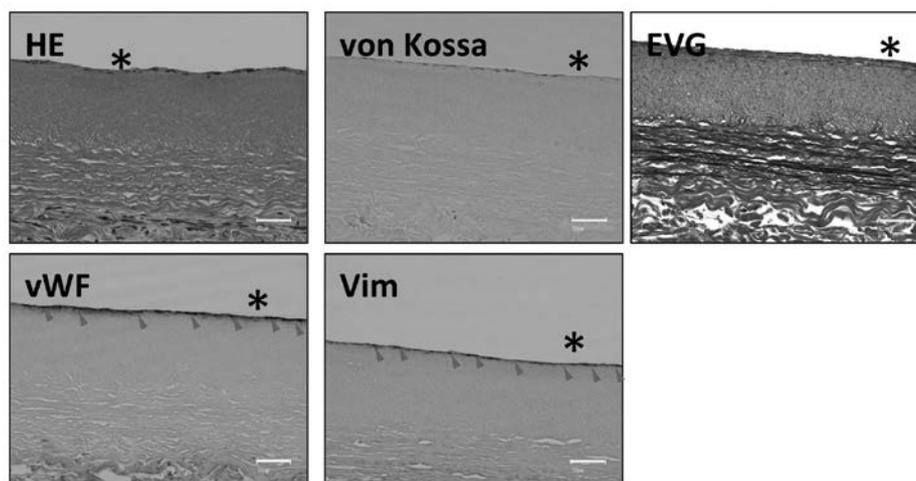


図6 移植3週間後の血管組織解析<sup>24)</sup>

## 文 献

- 1) 野一色 泰晴：人工血管開発における研究の動向。環境病態研報告 98-113, 1990
- 2) Deutsch M, Meinhart J, Fischlein T, et al: Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. *Surgery* **126**: 847-55, 1999
- 3) Deutsch M, Meinhart J, Zilla P, et al: Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts. *J Vasc Surg* **49**: 352-62, 2009; discussion 362
- 4) Deutsch M, Meinhart J, Zilla P, et al: Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts. *J Vasc Surg* **49**: 352-62, 2009
- 5) VOORHEES AB Jr, JARETZKI A 3rd, BLAKEMORE AH: The use of tubes constructed from vinyon "N" cloth in bridging arterial defects. *Ann Surg* **135**: 332-6, 1952
- 6) Xue L, Greisler HP: Biomaterials in the development and future of vascular grafts. *J Vasc Surg* **37**: 472-80, 2003
- 7) Kapadia MR, Popowich DA, Kibbe MR: Modified prosthetic vascular conduits. *Circulation* **117**: 1873-82, 2008
- 8) Glickman MH, Stokes GK, Ross JR, et al: Multicenter evaluation of a polyurethaneurea vascular access graft as compared with the expanded polytetrafluoroethylene vascular access graft in hemodialysis applications. *J Vasc Surg* **34**: 465-72, 2001
- 9) Boethig D, Thies WR, Hecker H, et al: Mid term course after pediatric right ventricular outflow tract reconstruction: a comparison of homografts, porcine xenografts and Contegras. *Eur J Cardiothorac Surg* **27**: 58-66, 2005
- 10) 松村 剛毅：細胞を用いずに自己の血管を再生させる人工血管。人工臓器 **40**: 236-9, 2011
- 11) Shin'oka T, Matsumura G, Hibino N, et al: Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* **129**: 1330-8, 2005
- 12) COLEMAN CC Jr, DETERLING RA Jr, PARSHLEY MS: Experimental studies of preserved aortic homografts. *Ann Surg* **134**: 868-77, 1951
- 13) Badylak S, Liang A, Record R, et al: Endothelial cell adherence to small intestinal submucosa: an acellular bioscaffold. *Biomaterials* **20**: 2257-63, 1999
- 14) 上野 明：わが国の血管外科の歩み。日血外会誌 **1**: 1-13, 1992
- 15) Isenberg BC, Williams C, Tranquillo RT: Small-diameter artificial arteries engineered in vitro. *Circ Res* **98**: 25-35, 2006
- 16) Kuwabara F, Narita Y, Yamawaki-Ogata A, et al: Long-term results of tissue-engineered small-caliber vascular grafts in a rat carotid arterial replacement model. *J Artif Organs* **15**: 399-405, 2012
- 17) Kuwabara F, Narita Y, Yamawaki-Ogata A, et al: Novel small-caliber vascular grafts with trimeric Peptide for acceleration of endothelialization. *Ann Thorac Surg* **93**: 156-63, 2012; discussion 163
- 18) Narita Y, Kagami H, Matsunuma H, et al: Decellularized ureter for tissue-engineered small-caliber vascular graft. *J Artif Organs* **11**: 91-9, 2008
- 19) Campbell JH, Efendy JL, Campbell GR: Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity. *Circ Res* **85**: 1173-8, 1999
- 20) Hayashida K, Kanda K, Yaku H, et al: Development of an in vivo tissue-engineered, autologous heart valve (the biovalve): preparation of a prototype model. *J Thorac Cardiovasc Surg* **134**: 152-9, 2007
- 21) Norotte C, Marga FS, Niklason LE, et al: Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials* **30**: 5910-7, 2009
- 22) Mori H, Matsuda H (Eds): *Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches*. Springer, 東京, 2005
- 23) Ehashi T, Nishigaito A, Fujisato T, et al: Peripheral nerve regeneration and electrophysiological recovery with CIP-treated allogeneic acellular nerves. *J Biomater Sci Polym Ed* **22**: 627-40, 2011
- 24) Mahara A, Somekawa S, Kobayashi N, et al: Tissue-engineered acellular small diameter long-bypass grafts with neointima-inducing activity. *Biomaterials* **58**: 54-62, 2015